

DÉVELOPPEMENT D'OUTILS DE DÉTECTION DE *CAMPYLOBACTER* SPP.

par

Melissa Arango Giraldo

Mémoire présenté au Département de biologie en vue de l'obtention du grade de
maître en sciences (M.sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Octobre 2017

Le 26 octobre 2017

*le jury a accepté le mémoire de Madame Melissa Arango Giraldo
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur François Malouin
Directeur de recherche
Département de biologie

Melissa Buzinhani
Évaluatrice interne
Laboratoires Foodchek Inc.

Professeur Ryszard Brzezinski
Évaluateur interne
Département de biologie

Professeur Sébastien Rodrigue
Président-rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

Campylobacter est la principale cause de diarrhée alimentaire chez les humains dans les pays industrialisés et la consommation de viande de volaille contaminée est la principale source d'infection. L'incidence élevée de la diarrhée causée par *Campylobacter*, leur durée et leurs séquelles potentielles leur confèrent une grande importance socioéconomique. Le dépistage de la bactérie dans les aliments est essentiel pour assurer un meilleur contrôle de la sécurité alimentaire et réduire le risque de campylobactériose. Les méthodes de culture traditionnelles pour la détection de *Campylobacter* spp. sont lentes et fastidieuses. Il existe un besoin de méthodes rapides, spécifiques et sensibles, tout en restant très faciles à utiliser.

Un anticorps polyclonal qui reconnaît les trois espèces de *Campylobacter* les plus couramment impliquées dans les maladies humaines (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*) a été développé et évalué pour être utilisé dans les tests de détection. La spécificité de l'anticorps polyclonal produit a été évaluée contre différentes souches de *Campylobacter* spp. et des espèces non cibles. Les résultats ont montré que le sérum polyclonal reconnaissait spécifiquement toutes les souches de *Campylobacter* testées et aucune réaction croisée avec des espèces non ciblées a été détectée. Ces résultats indiquent que ce sérum polyclonal serait utile comme test de dépistage pour la détection de *Campylobacter* spp.

Mots-clés : *Campylobacter* spp., tests de détection, anticorps, campylobactériose

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements aux personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire. En premier lieu, je remercie mon directeur de recherche François Malouin ainsi que ma codirectrice Melissa Buzinhani pour le temps qu'ils m'ont consacré, ils m'ont guidé dans mon travail et m'ont aidé à trouver des solutions pour avancer. Je remercie François pour sa patience et sa bonne humeur constante ; Melissa pour sa douceur et gentillesse.

Merci à mes conseillers Ryszard Brzezinski et Sébastien Rodrigue, pour leurs sages conseils. À tous les membres du laboratoire Malouin, spécialement Céline Ster, Eric Brouillette et Julie Côté-Gravel, pour toute leur aide et soutien.

Je remercie également tous les membres des Laboratoires Foodchek Inc. pour tous les beaux moments passés ensemble.

Je remercie le Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT) pour le soutien financier.

Finalement, je tiens à remercier mes chers parents, mon frère et mon conjoint pour leur support moral, encouragements et amour inconditionnel.

À toutes ces personnes, je témoigne ma plus profonde reconnaissance. Merci.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------|
| SOMMAIRE | iv |
| REMERCIEMENTS | v |
| TABLE DES MATIÈRES | vi |
| LISTE DES TABLEAUX | viii |
| LISTE DES FIGURES | ix |
| CHAPITRE 1 | 1 |
| INTRODUCTION | 1 |
| 1.1 Le genre <i>Campylobacter</i> | 1 |
| 1.1.1 Historique | 1 |
| 1.1.2 Caractéristiques générales | 2 |
| 1.2 Caractéristiques métaboliques | 2 |
| 1.2.1 Acquisition et métabolisme du carbone et de l'azote | 2 |
| 1.2.2 Acides aminés | 3 |
| 1.2.3 Intermédiaires du cycle de l'acide citrique | 4 |
| 1.2.4 Acides gras à chaîne courte | 4 |
| 1.3 Campylobacteriose | 5 |
| 1.4 Réservoirs de <i>Campylobacter</i> | 5 |
| 1.5 <i>Campylobacter</i> chez le poulet | 6 |
| 1.6 Pathogenèse | 6 |
| 1.6.1 Facteurs de virulence | 7 |
| 1.6.2 Flagelle | 7 |
| 1.6.3 Adhésion | 8 |
| 1.6.4 Cytolethal Distending Toxin (CDT) | 8 |
| 1.7 Prévalence et coûts | 9 |

| | |
|--|----|
| 1.8 Prévention | 9 |
| 1.9 Détection, isolement et confirmation de Campylobacter..... | 10 |
| 1.10 Normes..... | 11 |
| 1.11 Technologie immuno-chromatographie magnétique | 11 |
| 1.12 Projet de maîtrise | 13 |
| CHAPITRE 2 | 15 |
| ARTICLE 1 | 15 |
| 2.1. Avant-propos | 15 |
| 2.2. Contributions | 15 |
| 2.3. Résumé de l'article | 16 |
| 2.4 Insertion de l'article | 16 |
| ABSTRACT | 18 |
| IMPORTANCE | 18 |
| INTRODUCTION..... | 18 |
| MATERIALS AND METHODS..... | 20 |
| RESULTS..... | 29 |
| DISCUSSION | 37 |
| ACKNOWLEDGEMENTS..... | 40 |
| REFERENCES..... | 40 |
| CHAPITRE 3 | 44 |
| DISCUSSION | 44 |
| CONCLUSION GÉNÉRALE | 48 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 49 |

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 2 – Article 1

| | | |
|----------------|--|----|
| Table 1 | List of bacterial strains..... | 22 |
| Table 2 | Homology percentages of potential target proteins compared to <i>Campylobacter jejuni</i> | 30 |
| Table 3 | Antigenic B-cell epitopes of <i>C. jejuni</i> CstA identified using BCPreds server | 33 |

LISTE DES FIGURES

Liste des figures : Chapitre 1

| | | |
|-----------------|--|----|
| Figure 1 | Technologie immuno-chromatographique magnétique..... | 13 |
|-----------------|--|----|

Liste des figures : Chapitre 2

| | | |
|-----------------|---|----|
| Figure 1 | A) Relative expression of <i>cfrA</i> , <i>cstA</i> and <i>flgC</i> in <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> and <i>C. lari</i> . B) Relative expression of <i>cfrA</i> in <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> and <i>C. lari</i> in cultures supplemented with 6 mM of 2,2'-bipyridyl (+) or not(-)..... | 31 |
| Figure 2 | PCR detection of the gene coding for CstA in <i>Campylobacter</i> spp. | 32 |
| Figure 3 | Transmembrane topology of <i>C. jejuni</i> CstA | 34 |
| Figure 4 | Characterization of the polyclonal serum by ELISA..... | 35 |
| Figure 5 | Western blot analysis of <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. lari</i> and <i>E. coli</i> membranes treated with polyclonal serum diluted 1:750..... | 37 |

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Le genre *Campylobacter*

1.1.1 Historique

Il semblerait que le premier constat concernant *Campylobacter* a été fait par Theodore Escherich en 1886 qui a observé et décrit des bactéries spiralées non cultivables (King and Adams, 2008). Ensuite, *Campylobacter* a été identifié pour la première fois en 1906, lorsque deux vétérinaires Britanniques ont rapporté la présence d'un « grand nombre d'organismes particuliers » dans le mucus utérin d'une brebis enceinte (Skirrow, 2006). En 1913, McFadyean et Stockman ont isolé ces microorganismes à partir des fœtus bovins avortés. Plus tard, en 1927, Smith et Orcutt ont isolé un groupe de bactéries à partir des fèces de bétail avec diarrhée et l'ont nommé *Vibrio jejuni* (Vandamme, 2000). Dû à la faible composition en guanine et cytosine de leur ADN, leur métabolisme non fermentaire et leur nature micro-aérophile, le genre *Campylobacter* a été proposé pour la première fois en 1963 par Sebal et Véron, les distinguant ainsi des *Vibrio* spp. (On, 2001).

1.1.2 Caractéristiques générales

Les bactéries appartenant au genre *Campylobacter* sont des bacilles mobiles, à Gram négatif et non sporulées. Ces bactéries sont dotées d'un flagelle polaire situé à l'une des extrémités ou aux deux extrémités, lui conférant un mouvement en vrille et une forme effilée en « S » qui est caractéristique du genre (Penner, 1988). Dans les vieilles cultures et celles qui ont été exposées à l'air pendant une période prolongée, la bactérie peut apparaître sous forme sphérique ou coccoïde qui correspond à un état dormant viable mais non cultivable (Portner et al, 2007). Quelques espèces de *Campylobacter* (*C. coli*, *C. jejuni*, *C. lari* et *C. upsaliensis*) sont thermophiles et croissent de façon optimale à 42 °C (Allos, 2001). Le pH optimal pour la croissance de *Campylobacter* spp. est de 6.5-7.5. Elles ne survivent pas en dessous d'un pH de 4,9 et au-dessus d'un pH de 9,0. Ces bacilles sont essentiellement micro-aérophiles et se développent mieux dans une atmosphère à basse tension d'oxygène (5% d'O₂, 10% de CO₂ et 85% de N₂) (Garénaux et al., 2008).

1.2 Caractéristiques métaboliques

1.2.1 Acquisition et métabolisme du carbone et de l'azote

Campylobacter possède des propriétés métaboliques qui la distinguent clairement des autres bactéries entéropathogéniques. La plus frappante c'est son catabolisme des carbohydrates restreint. Contrairement à la plupart des bactéries, *Campylobacter* n'a pas la capacité d'utiliser les carbohydrates en tant que source de carbone (Parkhill et al., 2000). *Campylobacter* est donc considérée

comme une bactérie non saccharolytique. En plus de ne pas posséder les transporteurs nécessaires à l'assimilation des sucres comme le glucose et le galactose, il lui manque également plusieurs enzymes clés impliquées dans la voie glycolytique. Par exemple, elle ne possède aucune forme de glucokinase pour phosphoryler le glucose extracellulaire. Elle est aussi privée de 6-phosphofructokinase qui catalyse la phosphorylation du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-diphosphate pendant la glycolyse (Velayudhan and Kelly, 2002).

Il semble que *Campylobacter* serait capable de cataboliser quelques molécules comme le glycérol-3-phosphate, ce qui requière la présence des portions finales de la voie glycolytique (Hofreuter et al., 2006). D'un autre côté, cette bactérie possède les enzymes de la partie non oxydative du cycle des pentoses phosphate. Par contre, il lui manque tout la partie oxydative du cycle. Ce qui exclut la possibilité qu'elle soit en mesure de métaboliser les pentoses par cette voie (Line et al., 2010).

1.2.2 Acides aminés

Étant donné la nature assacharolytique de *Campylobacter*, l'utilisation d'acides aminés joue un rôle essentiel dans l'alimentation du métabolisme central de cette dernière. Toutefois, seulement quelques acides aminés glucogéniques sont dégradés par ce pathogène et supportent sa prolifération. Les acides aminés sont utilisés dans un ordre séquentiel : serine, aspartate, asparagine et glutamate. La proline peut également être métabolisée lorsque les autres nutriments sont épuisés (Wright et al., 2009).

1.2.3 Intermédiaires du cycle de l'acide citrique

Toutes les voies mentionnées plus tôt mènent à la production de pyruvate, fumarate, oxaloacetate ou 2-oxoglutarate. Ces derniers alimentent directement le cycle de l'acide citrique. Cela montre que *Campylobacter* dépend fortement du cycle de l'acide citrique pour ses besoins en énergie. De plus, cette bactérie est capable de transporter différents intermédiaires du cycle de l'acide citrique et de les utiliser directement comme source de nutriments. Par exemple, le succinate, le fumarate et le malate peuvent être transportés par DcuA et DcuB, deux transporteurs C4-dicarboxylate (Guccione et al., 2008). *Campylobacter* est connue pour être capable d'utiliser le pyruvate comme source principale de carbone. Par contre, aucun transporteur de pyruvate n'a pas encore été identifié. Le mécanisme par lequel le pyruvate est transporté dans la cellule est donc présentement inconnu (Stahl and Butcher, 2012).

1.2.4 Acides gras à chaîne courte

Des grandes quantités d'acides gras à chaîne courte (AGCC) sont retrouvées dans l'intestin. Ils sont les principaux produits de la fermentation bactérienne colique des glucides et des acides aminés (Duncan et al., 2004). Les AGCC sont rapidement absorbés par la muqueuse colique ou métabolisés par les bactéries présentes dans l'intestin. L'AGCC le plus retrouvé dans l'intestin est l'acétate, avec des petites quantités de lactate, propionate et butyrate également présentes (Belenguer et al., 2011). Des études suggèrent que *Campylobacter* est seulement capable de transporter et métaboliser l'acétate et le lactate (Thomas et al., 2011).

1.3 Campylobacteriose

Campylobacter est la cause majeure de gastroentérite bactérienne au monde (EFSA, 2008). La maladie infectieuse causée par les membres de ce genre bactérien est appelée campylobactériose. Après l'ingestion de la bactérie, *Campylobacter* adhère et envahit les cellules épithéliales qui recouvrent le tractus gastro-intestinal, induisant une réponse inflammatoire puissante (Backert et al., 2013). Il en résulte une diarrhée modérée à sévère qui peut être accompagnée de sang dans les selles, de crampes abdominales et de fièvre. La maladie peut durer jusqu'à dix jours, et la plupart des malades se rétablissent sans traitement. Alors que la campylobactériose est généralement caractérisée par une gastro-entérite, elle peut également conduire à la septicémie, à l'arthrite post-infectieuse, au syndrome de Guillain-Barré ou au syndrome de Miller Fisher (Goldstein et al., 2016). De plus, *Campylobacter* a récemment été associée à des maladies intestinales inflammatoires telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse (Kaakoush et al., 2014). Présentement, les espèces le plus fréquemment signalées comme à l'origine de maladies humaines sont *C. jejuni*, *C. coli* ainsi que *C. lari*.

1.4 Réservoirs de *Campylobacter*

Campylobacter peut être retrouvé dans les animaux de production alimentaire, comme la volaille, le bœuf, le porc et le mouton. Des études ont indiqué que la prévalence de la colonisation de *Campylobacter* chez les bovins est de 0% à 80% et de 20% chez les moutons (Moore et al, 2005). Par contre, la volaille et les produits de volaille constituent la source majeure de *Campylobacter*. En effet, la volaille cause de 50% -70% des infections à *Campylobacter*. La volaille

comprend les poulets de chair, les poules pondeuses, les dindes, les canards et les autruches (Nachamkin et al., 2008). Alors que l'ingestion de volailles contaminées est le principal mode d'infection dans les pays industrialisés, l'ingestion d'eau contaminée est généralement responsable des infections à *Campylobacter* dans les pays en voie de développement (Kaakoush et al., 2015).

1.5 *Campylobacter* chez le poulet

Campylobacter colonise principalement la volaille et se retrouve de façon prédominante dans le cécum et le côlon, où la population de *Campylobacter* peut atteindre 10^6 - 10^8 UFC/g de cécum (Meade et al., 2009). La température corporelle naturelle des espèces aviaires (40-42 °C) constitue un environnement idéal pour la croissance de *Campylobacter* (Hamrita et Conway, 2017). Dans les troupeaux de volailles, la colonisation naturelle des poussins se produit dans les 2 à 3 semaines suivant l'éclosion par une contamination horizontale à partir de l'environnement et les oiseaux restent habituellement colonisés à vie (Sahin et al., 2003). Lors de l'éviscération des poulets, il peut avoir rupture de l'intestin et le microorganisme peut se propager par contamination croisée dans la viande. Des études ont estimé que jusqu'à 98% de la viande de poulet de détail aux États-Unis et 60%-80% en Europe est contaminée par *C. jejuni*. La peau et les abats de poulet, contiennent les concentrations de *Campylobacter* les plus élevées (Bull et al., 2006).

1.6 Pathogenèse

1.6.1 Facteurs de virulence

Les mécanismes de virulence spécifiques de *Campylobacter* spp. n'ont pas encore été élucidés, probablement en raison du manque de similitude de la pathogénèse de *Campylobacter* et d'autres agents pathogènes (Guerry, 2007). La mobilité médiée par le flagelle, l'adhésion à la muqueuse intestinale, la capacité d'invasion et la production de toxines ont été identifiées comme facteurs de virulence (Silva et al., 2011). Il est connu que le flagelle est requis pour la colonisation du petit intestin, la bactérie se déplace ensuite jusqu'à l'organe cible, le colon (Poly and Guerry, 2008). L'invasion, qui cause de l'inflammation cellulaire, est probablement due à la production de cytotoxines. De plus, l'habilité du pathogène à atteindre le tractus intestinal est en part due à la résistance aux acides gastriques et aux sels biliaires (Van Deun et al., 2007). Plusieurs études ont signalé une meilleure capacité de colonisation de l'humain après un passage à travers la volaille (Cawthraw et al., 1996).

1.6.2 Flagelle

La motilité est essentielle à la survie dans les différentes conditions chimiotactiques rencontrées dans le tractus gastro-intestinal et pour la colonisation de l'intestin grêle (Guerry, 2007). *Campylobacter* montre une motilité inhabituelle, en particulier dans les substances visqueuses. Cela a été attribué à la présence d'un ou deux flagelles polaires et à la forme hélicoïdale des cellules. Le flagelle de *Campylobacter* est composé de deux flagellines hautement homologues, FlaA et FlaB. Le gène *flaA* semble être primordial pour l'invasion des cellules épithéliales. Il a été observé qu'une mutation dans ce gène mène à une forte réduction de la motilité (Guerry, 2007). Tandis qu'une mutation dans

flaB ne semble avoir aucun impact. Le gène *flaA* est responsable de l'expression de l'adhérence, la colonisation du tractus gastro-intestinal et l'invasion des cellules hôtes (Jain et al., 2008). Les mécanismes d'invasion de *Campylobacter* dans le poulet et dans les lignées cellulaires humaines sont similaires, mais pas identiques. Par exemple, *C. jejuni* survit intracellulairement dans les cellules épithéliales humaines T84 mais ne survit pas dans les entérocytes primaires du poulet (Van Deun et al., 2007).

1.6.3 Adhésion

L'adhérence de *Campylobacter* aux cellules épithéliales gastro-intestinales de l'hôte est primordiale pour la colonisation. Cette adhérence est médiée par plusieurs adhésines présentes sur la surface de la bactérie (Jin et al., 2001). L'adhésion de *Campylobacter* à la fibronectine est médiée par CadF, une protéine de liaison à la fibronectine (Konkel et al., 1997). La liaison à la fibronectine déclenche un processus de signalisation qui mène à l'activation des GTPases Rac1 et Cdc42 qui induisent l'internalisation de *Campylobacter* (Monteville et al. 2003).

1.6.4 *Cytotoxic Distending Toxin* (CDT)

Campylobacter produit différentes cytotoxines (Schulze et al., 1998). Par contre, seulement la CDT a été étudiée en détail. L'holotoxine CDT fonctionne comme une toxine de type "AB₂". CdtB est l'unité toxique active "A", tandis que CdtA et CdtC composent les unités "B₂". Les unités B₂ sont requises pour la liaison de la toxine aux cellules cibles et pouvoir ainsi livrer CdtB à l'intérieur de la cellule. Une

fois la toxine transportée dans le noyau de la cellule, la sous-unité CdtB, qui est une DNase, provoque des ruptures double brin de l'ADN ce qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire au stade G2 / M et l'apoptose (Méndez-Olvera et al., 2016).

1.7 Prévalence et coûts

Autant dans les pays industrialisés que dans les pays en voie de développement, *Campylobacter* provoque plus de cas de diarrhée que les bactéries du genre *Salmonella* et *Shigella*. Annuellement, elle affecte environ 1% de la population en Europe (Denny et al., 2007). Au Canada et aux États-Unis, elle affecte 26,7 et 13 habitants sur 100 000, respectivement (Ailes et al., 2008). En 2012, il y a eu 14% d'augmentation dans l'incidence des maladies d'origine alimentaire causées par *Campylobacter* aux États-Unis (CDC, 2013). Le coût de la campylobactériose pour les systèmes de santé publique et la perte de productivité en Europe est estimé par l'autorité Européenne de sécurité des aliments (EFSA) à environ 2,4 milliards d'euros par année (EFSA, 2012). Aux États-Unis, cette perte est estimée à 1.3 - 6.8 milliards de dollars annuellement (Scharff et al., 2012). Dans les pays développés, plus de 90% des cas de campylobacteriose se produisent pendant l'été en raison des viandes insuffisamment cuites dans le barbecue. Les gens de toutes les tranches d'âge peuvent être affectés, mais plus particulièrement les enfants en bas de quatre ans et les jeunes adultes de 15 à 44 ans (Heredia et al., 2009).

1.8 Prévention

Comme les poulets représentent la source majeure d'infections humaines dans le monde développé, il a été proposé qu'afin de diminuer l'incidence de la

campylobactériose, la colonisation aviaire doit être combattue (Meunier et al., 2016). Il a été prédit qu'une diminution de la colonisation par *Campylobacter* de la volaille de 2-log₁₀ réduirait de 30 fois les infections humaines. Beaucoup de recherches se sont concentrées sur la compréhension de la colonisation de la volaille par *Campylobacter*, car même une petite réduction pourrait avoir un impact extrêmement positif sur la santé humaine (Rosenquist et al., 2003).

1.9 Détection, isolement et confirmation de *Campylobacter*

La sensibilité de *Campylobacter* à l'oxygène et aux radicaux libres a mené au développement de plusieurs milieux sélectifs contenant un ou plusieurs désoxygénants, comme le sang, le fer ferreux et le pyruvate. L'efficacité de plusieurs milieux sélectifs, comme le *Bolton Broth* (BB), le *Campylobacter enrichment broth* (CEB) et le *Preston Broth* (PB) a été comparée (Baylis et al., 2000). L'incorporation de l'enzyme oxyrase dans ces milieux sélectifs, est particulièrement efficace pour réduire les niveaux d'oxygène et améliorer l'isolement de *Campylobacter* dans des échantillons naturellement contaminés (Abeyta et al., 1997).

La méthode standard la plus récente (ISO 10272, 2006) pour la détection et l'isolement de *Campylobacter*, utilise le mCCDA (Bolton et al., 1984) comme agar sélectif. Le bouillon Bolton (Bolton and Robertson, 1982) est utilisé pour l'étape d'enrichissement. La suspension est initialement incubée à 37 ° C dans une atmosphère micro aérophile pendant 4-6h, et par la suite à 41,5 ° C pendant 40-48h. Ensuite, un ensemencement sur mCCDA est effectué. Cependant, cette méthode n'est pas couramment utilisée dans les laboratoires dû à la difficulté à cultiver *Campylobacter* et à conserver les cultures de référence.

Plusieurs méthodes alternatives plus rapides ont été développées pour détecter et confirmer la présence de *Campylobacter*. Certaines utilisent l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) (Lehtola et al., 2006), des tests d'agglutination au latex (Wilma et al., 1992) ou des méthodes d'enrichissement physique (filtration) qui permettent la séparation de *Campylobacter* des autres organismes présents dans les matrices alimentaires (Baggerman and Koster, 1992). Il existe également des méthodes qui utilisent la réaction en chaîne par polymérase (PCR) (Debretsion et al., 2007).

1.10 Normes

Malgré la grande incidence des diarrhées causées par *Campylobacter*, ce n'est qu'en 2011 que l'*U.S. Department of Agriculture* (USDA) et le *Food Safety and Inspection Service* (FSIS) ont annoncé la mise en place de normes microbiologiques applicables aux carcasses de poulets et dindes, pour ce qui concerne la contamination par *Campylobacter*. La norme a été établie à huit échantillons positifs acceptables par ensemble de 51 échantillons pour les jeunes poulets et trois échantillons positifs acceptables par ensemble de 56 échantillons pour les dindes (FSIS Notice Number 54-12, 2011).

1.11 Technologie immuno-chromatographie magnétique

Les laboratoires Foodchek Inc. (St-Hyacinthe, QC, Canada) se spécialisent dans le développement et la commercialisation de tests de détection rapide des

bactéries pathogènes dans les aliments. La détection de *Campylobacter* dans les aliments est difficile en raison de l'état sublétal et le faible nombre dans lequel se retrouve la bactérie ainsi que par la haute concentration de la flore indigène. L'utilisation de tests rapides de détection nécessite l'enrichissement sélectif de *Campylobacter* afin qu'il puisse être détecté. L'enrichissement se fait dans le bouillon Bolton. Une fois l'échantillon enrichi, il est déposé dans un test (cassette). Le principe de la méthode repose sur le système MICT (*Magnetic Immuno-Chromatographic Technology*). La cassette est constituée de particules super paramagnétiques conjuguées à un anticorps spécifique qui lie un antigène cible du pathogène. L'échantillon se déplace par capillarité dans la cassette et les bactéries cibles se lient aux anticorps conjugués aux particules super paramagnétiques. Cela forme un complexe immun antigène-anticorps, ce complexe immun est attrapé par les anticorps de la zone de capture qui reconnaissent également l'antigène cible. Il en résulte une accumulation de particules magnétiques dans cette zone. Les nanoparticules sont ensuite excitées par un champ magnétique créé par un électro-aimant. Le signal magnétique émis par les nanoparticules est détecté par l'appareil de lecture MICT. En aval, il y a une "ligne de contrôle" qui contient des anticorps qui reconnaissent la partie Fc des anticorps et agit de façon à vérifier que le test a été exécuté correctement (voir Figure 1).

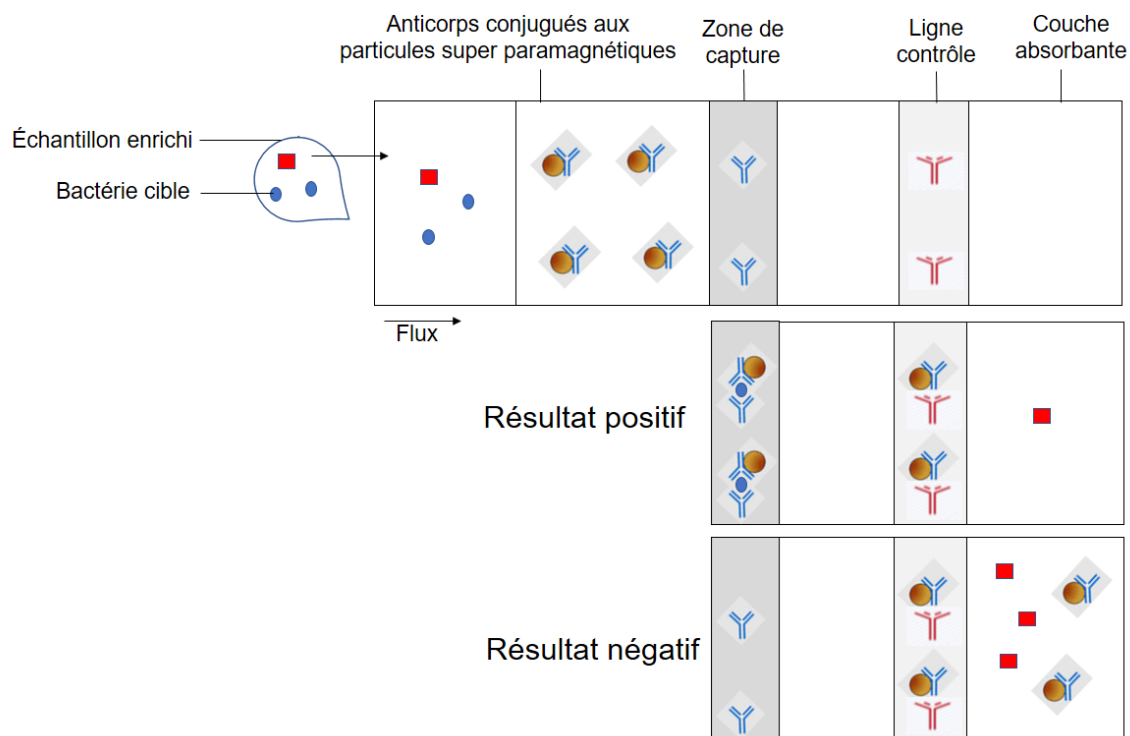


Figure 1 – Technologie immuno-chromatographique magnétique

1.12 Projet de maîtrise

Mon projet de recherche en partenariat avec l'Université de Sherbrooke et les Laboratoires Foodchek Inc. visait à donner de meilleurs outils à l'industrie et aux agences gouvernementales pour prévenir la campylobactériose. L'objectif général était de développer un test de dépistage de *Campylobacter* simple, fiable et économique, qui ne nécessiterait pas d'investissement important en équipement ou de longue formation pour le mettre en place et l'utiliser dans l'industrie.

Mon hypothèse de travail était de développer un anticorps capable de reconnaître efficacement les 3 espèces de *Campylobacter* le plus souvent impliquées dans des maladies humaines, soit *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons élaboré des objectifs spécifiques. Le premier objectif spécifique consistait à trouver une protéine conservée et hautement homologue chez les trois espèces cible de *Campylobacter*. Le deuxième objectif était de trouver une région immunogène dans la protéine choisie afin de produire un sérum polyclonal. Finalement, le dernier objectif était de caractériser le sérum polyclonal obtenu et d'évaluer sa pertinence comme outil de détection de *Campylobacter* spp.

CHAPITRE 2

ARTICLE 1

2.1. Avant-propos

Dans la présente étude, nous voulions développer un anticorps capable de reconnaître efficacement les 3 espèces de *Campylobacter* le plus souvent impliquées dans des maladies humaines, soit *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* afin qu'il soit utilisé dans des tests de détection des contaminations et la prévention des campylobactérioses. Les résultats de nos travaux seront soumis pour publication au journal « Applied and Environmental Microbiology » (AEM).

2.2. Contributions

Melissa Arango Giraldo (1^{ère} auteure) : Élaboration des protocoles. Expérimentatrice principale qui a généré et analysé les résultats. Rédaction de la première version de l'article.

Céline Ster (2^{ème} auteure) : Élaboration des protocoles, suivi et analyse des résultats.

Eric Brouillette (3^{ème} auteur) : Responsable de l'immunisation des souris.

Melissa Buzinhani (4^{ème} auteure) : Chercheuse co-responsable du projet, analyse des résultats.

François Malouin (5^{ème} auteur) : Chercheur responsable du projet, analyse des

résultats, supervision dans la rédaction de l'article.

2.3. Résumé de l'article

Un anticorps polyclonal qui reconnaît les trois espèces de *Campylobacter* les plus couramment impliquées dans les maladies humaines (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*) a été développé et évalué pour être utilisé dans des tests de détection. Une analyse bio-informatique a permis de trouver trois protéines présentes dans ces trois espèces qui montraient une grande homologie des acides aminés entre les espèces cibles de *Campylobacter* et une faible homologie à d'autres espèces non cible : *Ferric Enterobactin Uptake Receptor* (CfrA), *Carbon Starvation Protein* (CstA) et *Flagellar Hook-Associated Protein* (FlgC). Ces protéines ont ensuite été analysées à l'aide de critères établis tels la présence de régions immunogènes et leur expression relative. Cette analyse a permis de choisir la CstA comme cible pour la production d'anticorps polyclonaux. La présence et l'expression de cette protéine ont été vérifiées dans plusieurs souches de *Campylobacter*. La spécificité de l'anticorps polyclonal produit a été évaluée contre 30 *Campylobacter* spp. et 22 espèces non cibles. L'ELISA a montré que le sérum immun polyclonal reconnaissait toutes les souches de *Campylobacter* testées et qu'il n'y avait aucune réaction croisée avec des espèces non cibles. Les résultats indiquent que cet anticorps polyclonal est utile comme outil de dépistage pour la détection de *Campylobacter* spp.

2.4 Insertion de l'article

Development and characterization of polyclonal antibodies for specific detection of *Campylobacter* spp

Melissa Arango Giraldo^{1,2}, Céline Ster¹, Eric Brouillette¹, Melissa Buzinhani², François Malouin¹

¹ Département de biologie, Faculté de sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada

² Laboratoires Foodchek Inc., St-Hyacinthe, QC, Canada

Running title: Polyclonal antibody for detection of *Campylobacter* spp

ABSTRACT

Campylobacter is the leading cause of food-borne diarrhea in humans in the developed world and consumption of contaminated poultry meat is the main source of infection. A polyclonal antibody that recognizes the three most commonly reported species of *Campylobacter* involved in this disease (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*) was developed and evaluated for use in detection tests. Bioinformatic analysis allowed the identification of three proteins based on their high amino acid homology in the three target species but a weak homology for non-target species. The Ferric Enterobactin Uptake Receptor (CfrA), the Carbon Starvation Protein (CstA), and the Flagellar Hook-Associated Protein (FlgC) were further analyzed using established criteria such as the presence of immunogenic regions and their relative expression. This analysis led to the selection of the carbon starvation protein (CstA) as the most promising target protein for polyclonal antibody production. The presence and expression of CstA were verified in several strains of *Campylobacter*. The specificity of the resulting anti-

CstA polyclonal antibody was also evaluated against 30 *Campylobacter* spp., including poultry isolates, as well as 22 non-*Campylobacter* spp. ELISA showed that the polyclonal immune serum recognized all *Campylobacter* strains tested and revealed no cross-reaction with non-target species. These results suggest that this anti-CstA polyclonal antibody could be useful for the detection of *Campylobacter* spp in food detection assays.

IMPORTANCE

The high incidence of *Campylobacter* diarrhea, their duration and potential sequelae confer them a major socio-economic importance. Screening for this bacterium in food is essential to ensure better control of food safety and thus reduce the risk of campylobacteriosis. Traditional cultivation methods for the detection of *Campylobacter* spp. are slow and tedious. There is a need for rapid and easy to use methods for the specific and sensitive detection of *Campylobacter* spp. We report the production of a polyclonal antibody that shows a strong potential for the detection of *Campylobacter* spp. in food detection tests.

INTRODUCTION

Bacteria belonging to *Campylobacter* genus are mobile, Gram negative and non-sporulated bacilli. These bacteria are endowed with a polar flagellum located at one end or at both ends, giving them a spin-like movement and a "S" shape that is characteristic of the genus (Penner, 1988). In old cultures and those that have been exposed to air for a prolonged period, the bacterium may appear in

spherical or coccoid form that corresponds to a viable but non-culturable (VBNC) dormant state. This microorganism is fastidious because of its relatively slow growth (generation time of 1 hour under optimum conditions) and the need for rigorous culture conditions. Indeed, *Campylobacter* is a micro aerophilic bacterium, it needs an oxygen concentration of 3-5% and carbon dioxide of 3-10% (Bhunias, 2008). Some *Campylobacter* species (*C. coli*, *C. jejuni*, *C. lari* and *C. upsaliensis*) are thermophilic and grow optimally at 42 ° C (Allos, 2001). This bacterium uses amino acids rather than carbohydrates as energy source (Vandamme et al, 2010). Animals are the main reservoir of *Campylobacter*, it can be found in chickens, rabbits, birds, cows, pigs and even domesticated animals.

Campylobacter is the major cause of bacterial gastroenteritis in the world (EFSA, 2008). The infectious disease caused by members of this bacterial genus is called campylobacteriosis (Altekruse et al, 1999). Characteristics symptoms of infection include watery diarrhea, inflammatory enterocolitis, abdominal pain, fever, nausea and vomiting (Allos, 2001). Currently, the species most frequently reported as causing human diseases are *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari*. Most outbreaks are foodborne and poultry products are a major source of *Campylobacter* (Bhunias, 2008). In developed and developing countries, it causes more cases of diarrhea than bacteria of the genus *Salmonella* and *Shigella*. Annually, it affects about 1% of the population in Europe (Denny et al, 2007). In Canada and the United States, it affects 13 and 26.7 of every 100,000 habitants, respectively (Ailes et al, 2008). In 2012, there was a 14% increase in the incidence of foodborne illness caused by *Campylobacter* in the United States (CDC, 2013).

The high incidence of *Campylobacter* diarrhea, their duration and potential sequelae make them of great socioeconomic importance. The cost of campylobacteriosis to public health systems and loss of productivity in Europe is

estimated by the European Food Safety Authority (EFSA) at around € 2.4 billion per year (EFSA, 2012). Detection of this bacteria in food becomes essential to ensure better control of food safety and thus reduce the risk of campylobacteriosis. In this study, a polyclonal antibody that specifically recognizes the three most commonly reported *Campylobacter* species causing human disease (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*) was developed for use in detection tests.

MATERIAL AND METHODS

Selection of target proteins for antibody production

Identification of potential target genes. The genomes of *Campylobacter jejuni* (ACN78426.1), *Campylobacter coli* (AAC45421.1) and *Campylobacter lari* (WP_012661200.1) were compared using the SEED bioinformatics tool (<http://pubseed.theseed.org/>). This software allows comparative analysis and annotation of genomes. SEED also allows to divide the genes into functional subsystems (Overbeek et al., 2014). Using SEED subsystems, genes present in the target species and involved in metabolic functions that are likely to be expressed in most conditions were selected for detailed investigations.

Verification of amino acid identity. Amino acid identity on the complete sequence of common proteins was verified by BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance. (Ye J. et al, 2006)

Evaluation of the relative expression level of target genes by qPCR

RNA extractions of *C. jejuni* ATCC 33292, *C. coli* ATCC 49941 and *C. lari* ATCC BAA-1060 were performed with RNeasy kit (QIAGEN). Total RNA was converted to cDNA using random hexamers primers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). 1 µg of RNA, 0.5 mM of dNTPs and 50 ng of random hexamers were heated at 65°C for 5 min. After cooling to room temperature, RT 5X buffer and dithiothreitol (DTT) were added. The reaction was heated for 2 min at 42°C. Then, 200 U of Superscript II were added and the reaction proceeded for 10 min at 25°C, followed by 50 min at 42°C. Finally, the reverse transcriptase was inactivated at 70°C for 15 min. cDNA was purified by using QIAquick PCR purification kit (QIAGEN). Specific primers for real-time PCR were designed using PrimerQuest tool (Integrated DNA Technologies). Real-time PCR was performed using a Stratagene Mx3000P (Stratagene, La Jolla, CA) as follows: the reaction mixture consisted of 10 µl of real-time PCR Master Mix, 100 nM of primers, 1 µL cDNA 125 µM dNTPs and 0,5 U of JumpStart Taq DNA Polymerase (Sigma). The final volume of the mixture was adjusted to 20 µl with the addition of DNase- and RNase-free H₂O. Amplification was started at 95°C for 30 s as the first step, followed by 35 cycles of PCRs: at 95°C for 15 s, at 55°C for 30 s, and at 72°C for 1 min, successively. Gene expression levels were determined using the 16S rRNA as internal control gene. Delta Ct was calculated and results are expressed as $1/2^{-\Delta Ct}$. qPCR was also done with cultures treated for 4 h with 6mM of 2,2'-bipyridyl (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) to create an iron-deficient medium.

Ubiquity evaluation of candidate protein by PCR. Whole genomic sequences of bacterial strains (Table 1) were extracted with the GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, Oakville, ON), according to the recommendations of the manufacturer. Although virtual PCR were performed to demonstrate the ubiquity of the target proteins in all *Campylobacter spp.* sequenced genomes,

experimental PCRs were performed to verify the presence of selected gene in 44 different strains of *Campylobacter* (Table 1). Each 25 µl reaction mixture consisted of 10 ng of genomic DNA, 0.5 µM primers and 0.005 U Q5 High-Fidelity DNA Polymerase. PCRs were carried out using 95°C for 30 s, followed by 35 cycles of 10 s at 98°C, 20 s at 65°C, and 40 s at 72°C, and finished with a 2 min incubation at 72°C. Products were subsequently resolved on a 1% agarose gel.

TABLE 1. List of bacterial strains

| Strain ^a | Origin | Test |
|--|-------------|--------------------------------|
| <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33292 | Human feces | PCR, qPCR, ELISA, Western blot |
| <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 35921 | Human | PCR |
| <i>Campylobacter jejuni</i> MSR0237 | Chicken | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter jejuni</i> MSR0238 | Chicken | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter jejuni</i> MSR0239 | Chicken | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter jejuni</i> MSR0240 | Chicken | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter jejuni</i> MSR0241 | Chicken | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter jejuni</i> MSR0242 | Chicken | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter jejuni</i> MSR0243 | Chicken | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter jejuni</i> MSR0244 | Chicken | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter jejuni</i> MSR0245 | Chicken | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter jejuni</i> MSR0246 | Chicken | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter jejuni</i> MSR0247 | Chicken | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter jejuni</i> MSR0248 | Chicken | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter jejuni</i> MSR0249 | Chicken | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter jejuni</i> MSR0250 | Chicken | PCR |
| <i>Campylobacter jejuni</i> MSR0251 | Chicken | PCR |
| <i>Campylobacter jejuni</i> MSR0544 | Chicken | PCR |
| <i>Campylobacter jejuni</i> MSR0546 | Chicken | PCR |

| | | |
|---|------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Campylobacter jejuni</i> MSR0545 | Ovine | PCR |
| <i>Campylobacter coli</i> ATCC 33559 | Pig feces | PCR |
| <i>Campylobacter coli</i> ATCC 49941 | API System bioMerieux | PCR, qPCR, ELISA, Western blot |
| <i>Campylobacter coli</i> MSR0197 | Turkey | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter coli</i> MSR0198 | Turkey | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter coli</i> MSR0264 | Chicken | PCR |
| <i>Campylobacter coli</i> MSR0265 | Turkey | PCR |
| <i>Campylobacter coli</i> MSR0266 | Chicken | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter coli</i> MSR0267 | Chicken | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter coli</i> MSR0268 | Chicken | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter coli</i> MSR0270 | Chicken | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter coli</i> MSR0271 | Chicken | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter coli</i> MSR0272 | Chicken | PCR |
| <i>Campylobacter coli</i> MSR0273 | Swine | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter coli</i> MSR0274 | Chicken | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter coli</i> MSR0275 | Chicken | PCR |
| <i>Campylobacter coli</i> MSR0276 | Swine | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter coli</i> MSR0278 | Chicken | PCR |
| <i>Campylobacter coli</i> MSR0279 | Turkey | PCR |
| <i>Campylobacter lari</i> ATCC 35221 | Herring gull cloacal swab | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter lari</i> ATCC 35222 | Dog feces | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter lari</i> ATCC 35223 | Child feces | PCR, qPCR, ELISA, Western blot |
| <i>Campylobacter lari</i> ATCC 43675 | Human feces | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter lari</i> ATCC BAA-1060 | Human feces | PCR, ELISA |
| <i>Campylobacter lari</i> MSR0554 | Swine | PCR, ELISA |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | UdeS | ELISA |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966 | Milk | ELISA |

| | | |
|--|---|---------------------|
| <i>Alcaligenes faecalis</i> | UdeS | ELISA |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051 | N/A | ELISA |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 | Derived from <i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634 | ELISA |
| <i>Bacillus cereus</i> | UdeS | ELISA |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 35029 | BBL Microbiology Systems | ELISA |
| <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 23355 | Stanford University | ELISA |
| <i>Enterococcus gallinarum</i> | UdeS | ELISA |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | Clinical isolate | ELISA |
| <i>Escherichia coli</i> K12 | UdeS | ELISA |
| <i>Escherichia coli</i> K12 AB 2847 | N/A | ELISA, Western blot |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 43165 | Clinical isolate | ELISA |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 | NCTC | ELISA |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | UdeS | ELISA |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933 | Human vagina | ELISA |
| <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315 | NCTC | ELISA |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | Blood culture | ELISA |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | UdeS | ELISA |
| <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 | Heart and liver chicken tissue | ELISA |
| <i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100 | NR Smith | ELISA |

^aThe ATCC strains were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), the MSR strains from the Foodchek Inc. culture collection (St-Hyacinthe, QC, Canada), and the UdeS strains from F. Malouin (Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada).

Peptide selection for antibody production

Subcellular localization prediction. The subcellular localization of proteins was predicted using CELLO (<http://cello.life.nctu.edu.tw>), an approach based on multi-class SVM classification system. CELLO uses four types of sequence coding schemes: the amino acid composition, the dipeptide composition, the partitioned amino acid composition and the sequence composition based on the physico-chemical properties of amino acids. (Yu CS et al, 2006)

Epitope prediction of protein antigens. Potentially immunogenic regions were predicted by using the BCPreds server 1.0 (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/>). This server uses an antigenic peer scale of amino acids. This scale assigns a value to each dipeptide. The peaks of amino acids are generated by decomposing the peptides. The database consists of 872 positive epitopes and 872 negative epitopes (Chen J et al., 2007).

Transmembrane topology of the target protein. Transmembrane topology of target protein was checked using TMHMM online tool (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). TMHMM is a tool for predicting the topology of membrane proteins using a hidden Markov model. It predicts transmembrane helices and discriminates the soluble proteins of membrane proteins with a high degree of precision (Moller S et al., 2001).

Immunization of mice. The 40 amino acids peptide GIQKIMPYEEGNKVANAVSHVAAVNIQSQKIKDLEFKLNN-NH₂ was synthesized by Biomatik Inc. (Cambridge, ON, Canada) with a purity of 96.25% and was used as antigen for immunization. Upon receipt, the peptide was suspended in sterile

water at a concentration of 5 mg/mL and stored at -80°C until day of use. For the preparation of the immunization dose, the peptide was mixed and suspended in PBS containing 20% of the EMULSIGEN®-D oil-in-water emulsion adjuvant to obtain a final dose of 20 µg of polypeptide per injection in 100 µl. Four female CD-1 mice were injected 3 times in the back of the neck at week 0, 3 and 5, and blood samples taken before the first immunization (preimmune sera) and 10 days after the last injection (immune sera). The blood aliquots were allowed to clot at room temperature for an hour, and were then centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C. The sera were harvested and kept at -20°C until subsequent analysis.

Serum characterization

Preparation of bacterial fractions. Bacterial lysates were prepared by suspending $\sim 10^7$ cells of 30 different *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* strains and 22 non-*Campylobacter* species (strains that were used in ELISA are identified in TABLE 1) in 1 mL of carbonate-bicarbonate buffer and boiled for ten minutes. Bacterial membranes were prepared by suspending cells from a 50 mL culture of *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* or *E. coli* in 7 mL of 10 mM HEPES buffer, pH 7.4, and lysed by French pressure cell disruption. The lysed cell preparation was centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C to remove cell debris and intact cells. The membranes were collected by ultracentrifugation at 100,000 g for 1 h at 4°C (Beckman, Ti70.1 rotor). The pellet was suspended in 500 µL 10 mM HEPES, pH 7.4. Membrane protein concentrations were determined by using micro BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA).

ELISA. Reactivity between the serum and the peptide used for immunization as well as with bacterial membranes from *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* and *E. coli* was

determined by ELISA. Peptide and membranes were diluted at 10 mg/mL in carbonate-bicarbonate buffer for use in ELISA plates (100 µl/well). The plates were incubated overnight at 4°C followed by incubation for 1 h at 37°C with 5% milk. Then, incubation with primary antibody dilution 1:15,000 – 1:405,000 for the peptide and 1:500 for bacterial membranes. The preimmune serum diluted at 1:1,500 was used as negative control. Then, incubation with a secondary antibody solution (HRP-conjugated anti-mouse immunoglobulins; dilution 1:10,000) at 37°C for 1 h; all antibodies were diluted with PBST containing 1% milk and 0.05% Tween 20. After color development and cessation of the reaction, the optical density (OD) value of each well was measured using microplate reader at a wavelength of 450 nm. For bacterial lysates, the same procedure was used except that primary antibody was diluted 1:1,500.

PAGE and electroblotting. A total amount of 20 µg of bacterial membranes was added to a mixture containing 6X Laemmli loading buffer (4% sodium dodecyl sulfate, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue and 0.125 M Tris HCl; pH 6.8). The samples were heated at 95°C for 10 min. Samples were run on 4–15% gel at 110 V for 1 h 45 min using Towbin buffer with SDS (25 mM Tris Base, 192 mM glycine, 0.1% SDS; pH 8.3). Following completion of the PAGE run, samples were transferred to a PVDF membrane (Millipore; Darmstadt, Germany) using Towbin buffer. Membranes were transferred at 100 V for 1 h.

Western blot. PVDF membranes were blocked for 1 h in 5 % milk/TBST, incubated in primary antibody (polyclonal serum 1:750) overnight, washed with TBST, incubated in secondary antibody (HRP-conjugated anti-mouse immunoglobulins; dilution 1: 10,000) for 1 h, washed with TBST, and revealed with Pierce DAB substrate kit (ThermoFisher Scientific).

Protein digestions and mass spectrometry. Protein digestion and mass spectrometry analyses were performed by the Proteomics Platform of the Université de Laval Research Center (Quebec, Qc, Canada). Bands of interest were extracted from gels after PAGE as described above and placed in 96-well plates and then washed with water. Tryptic digestion was performed on a liquid handling robot (MultiProbe, Perkin Elmer) according to the manufacturer's specifications and to the protocol of Shevchenko et al (1996) with the modifications suggested by Havlis et al (2003). Briefly, proteins were reduced with 10mM DTT and alkylated with 55mM iodoacetamide. Trypsin digestion was performed using 126nM of modified porcine trypsin (Sequencing grade, Promega, Madison, WI) at 37°C for 18h. Digestion products were extracted using 1% formic acid, 2% acetonitrile followed by 1% formic acid, 50% acetonitrile. The recovered extracts were pooled, vacuum centrifuge dried and then resuspended into 12 µl of 0.1% formic acid and 5 µl were analyzed by mass spectrometry.

Peptide samples were separated by online reversed-phase (RP) nanoscale capillary liquid chromatography (nanoLC) and analyzed by electrospray mass spectrometry (ES MS/MS). The experiments were performed with a Ekspert NanoLC425 (Eksigent) coupled to a 5600+ mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA) equipped with a nanoelectrospray ion source. Peptide separation took place on a picofrit column (Reprosil 3u, 120A C18, 15 cm x 0.075 mm internal diameter, New Objective, Woburn, Ma). Peptides were eluted with a linear gradient from 5-35% solvent B (acetonitrile, 0.1% formic acid) in 35 minutes, at 300 nL/min. Mass spectra were acquired using a data dependent acquisition mode using Analyst software version 1.7. Each full scan mass spectrum (400 to 1250 m/z) was followed by collision-induced dissociation of the twenty most intense ions. Dynamic exclusion was set for a period of 12 sec and a tolerance of 100 ppm.

Data base searching. All MS/MS samples were analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.5.1). Mascot was set up to search the TAX_Campylobacter_jejuni_197_201603018 database (unknown version, 91006 entries), CP_CampyColi_ci_195_20161031 database (unknown version, 3501 entries) and CP_CampyLari_ci_201_20161031 database (unknown version, 1711 entries) indicating that the peptides have been generated by digestion with trypsin. Mascot was searched with a fragment ion mass tolerance of 0,100 Da and a parent ion tolerance of 0,100 Da. Carbamidomethyl of cysteine was specified in Mascot as a fixed modification. Deamidation of asparagine and glutamine and oxidation of methionine were specified in Mascot as variable modifications.

Criteria for protein identification. Scaffold (version Scaffold_4.5.1, Proteome Software Inc., Portland, OR) was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications. Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 95,0 % probability by the Scaffold Local FDR algorithm. Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 95,0 % probability and contained at least 1 identified peptide. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm (Nesvizhskii, Al et al Anal. Chem. 2003;75(17):4646-58). Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony.

RESULTS

Selection of target protein for antibody production

Bioinformatic analyses using SEED allowed the identification of proteins commonly found in three *Campylobacter* species of interest. These proteins were analyzed by Blast using established criteria such as the presence of regions with high homology between the three target *Campylobacter* species and low homology to non-target species. This analysis led to the selection of three proteins specific to the 3 *Campylobacter* species: the carbon starvation protein (CstA), the Ferric enterobactin uptake receptor (CfrA), and the Flagellar hook-associated protein (FlgC) (Table 2).

TABLE 2. Similarity percentages of potential target proteins compared to *Campylobacter jejuni*

| Protein | <i>C. coli</i> | <i>C. lari</i> |
|--|------------------|----------------|
| Carbon starvation protein A (CstA) | 94% ^a | 83% |
| Ferric enterobactin uptake receptor (CfrA) | 92% | 83% |
| Flagellar hook-associated protein (FlgC) | 98% | 90% |

^a Percentages are relative to *C. jejuni*

Relative expression of the selected genes was determined by qPCR. Results showed that the gene coding for CfrA, an iron-related protein (Miller et al, 2009), was weakly expressed and only in the presence of 2,2'-bipyridyl, an iron chelator used to create an iron-deficient environment (Figure 1B). As for the *cstA* and *flgC* genes, both were well expressed in the *Campylobacter* target species (Figure 1A).

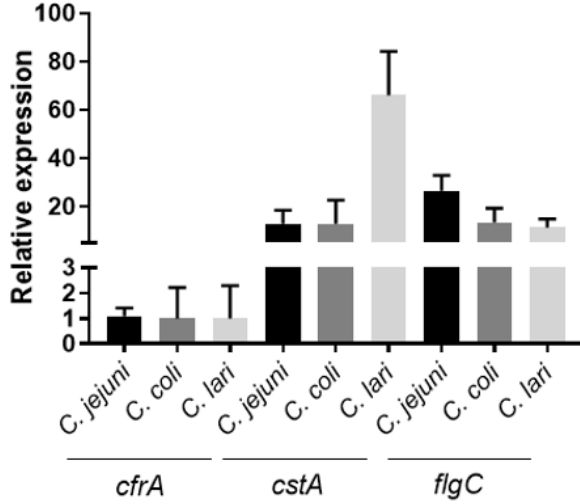
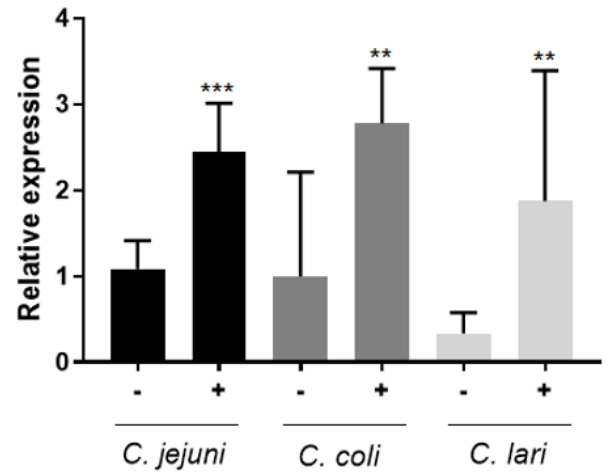
A**B**

Figure 1. A) Relative expression of *cfrA*, *cstA* and *flgC* in *C. jejuni* ATCC 33292, *C. coli* ATCC 49941 and *C. lari* ATCC 35223. B) Relative expression of *cfrA* in *C. jejuni* ATCC 33292, *C. coli* ATCC 49941 and *C. lari* ATCC 35223 in cultures supplemented with 6 mM of 2,2'-bipyridyl (+) or not (-). Significant differences in comparison to the untreated control are shown by asterisks. Statistical analysis was performed using non-parametric one-way ANOVA: ns, no-significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

The ubiquity of *cstA* was demonstrated by experimental PCR. All the 44 *Campylobacter* species and strains tested were positive for the presence of the *cstA* gene (Figure 2).

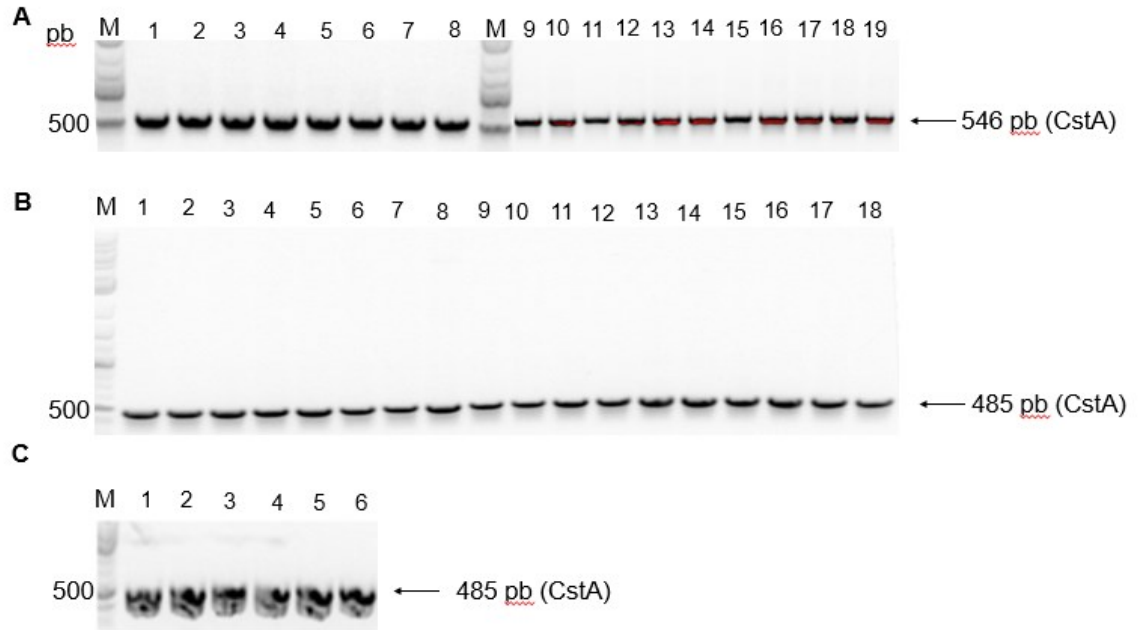


Figure 2. PCR detection of the gene coding for CstA in *Campylobacter* species. A) Gene *cstA* amplification in *C. jejuni* strains; Lane M: 1kb plus ladder; Line 1: *C. jejuni* ATCC 33292; Line 2: *C. jejuni* ATCC 35921; Lines 3-16: *C. jejuni* MSR0237-MSR0251; Lines 17-19: *C. jejuni* MSR0544-MSR0546 B) in *C. coli* strains; Line 1: *C. coli* ATCC 33559; Line 2: *C. coli* ATCC 49941; Lines 3-4: *C. coli* MSR0197-MSR0198; Lines 5-9: *C. coli* MSR0264-MSR0268; Lines 10-16: *C. coli* MSR0270-MSR0276; Lines 17-18: *C. coli* MSR0278-MSR0279 and C) in *C. lari* strains; Line 1: *C. lari* ATCC 35221; Line 2: *C. lari* ATCC 35222; Line 3: *C. lari* ATCC 35223; Line 4: *C. lari* ATCC 43675; Line 5: *C. lari* ATCC BAA-1060; Line 6: *C. lari* MSR0554.

Peptide selection for antibody production

The subcellular localization of CstA was predicted using CELLO. The CELLO output gave significant reliability for inner membrane (4.677). Then, potentially immunogenic regions of CstA were predicted by using the BCPreds server 1.0. A

total of 13 epitopes were predicted from 703 amino acids. The predicted epitopes are shown in Table 3.

TABLE 3. Antigenic B-cell epitopes of *C. jejuni* CstA identified using the BCPreds server

| Position of amino acid sequence | Epitope sequence | Score |
|---------------------------------|--------------------|-------|
| 66 | NRATPALVENDGRDFVPT | 1 |
| 94 | AAIAGAGPLVGPILAAQM | 1 |
| 212 | FIRPGRVGEASIIGFVLL | 1 |
| 238 | VIAADPYWAKIFTLEAPT | 0.035 |
| 271 | PVWFLAPRDYLSFLKI | 1 |
| 296 | VAIVLVAPDLQMPKANTQ | 1 |
| 350 | TTPKMLENETHALAVGYG | 0.001 |
| 413 | SSWGFSTPPEITTLTTN | 1 |
| 499 | GNVYKPLGDIHNYPAGLL | 0 |
| 537 | KGGIYTLWPLFGVSNQML | 1 |
| 570 | GKARYTWVTLVPAVFVLV | 1 |
| 596 | KIMPYEEGNKVANAVSHV | 1 |
| 618 | IQSQKIKDLEFKLNNTKD | 1 |

Transmembrane topology of the CstA protein was checked using TMHMM online tool. The TMHMM server showed that residues 27-30, 110-118, 182-190, 241-254, 307-320, 387-464, 531-539 and 595-660 presented outside region, residues 7-26, 31-53, 87-109, 119-138, 159-181, 191-213, 218-240, 255-277, 284-306, 321-343, 364-386, 465-487, 508-530, 540-563, 575-594 and 661-683 were within the transmembrane and residues 1-6, 54-86, 139-158, 214-217, 278-283, 344-363, 488-507, 563-574 and 684-703 were inside the region of the protein.

TMHMM suggested the presence of 16 TM helix. A consensus predicted topology is presented in Figure 3.

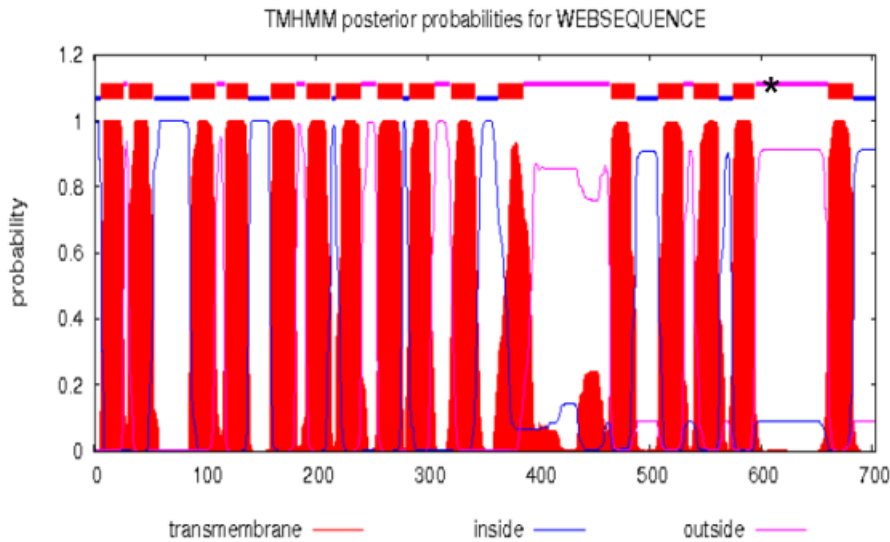


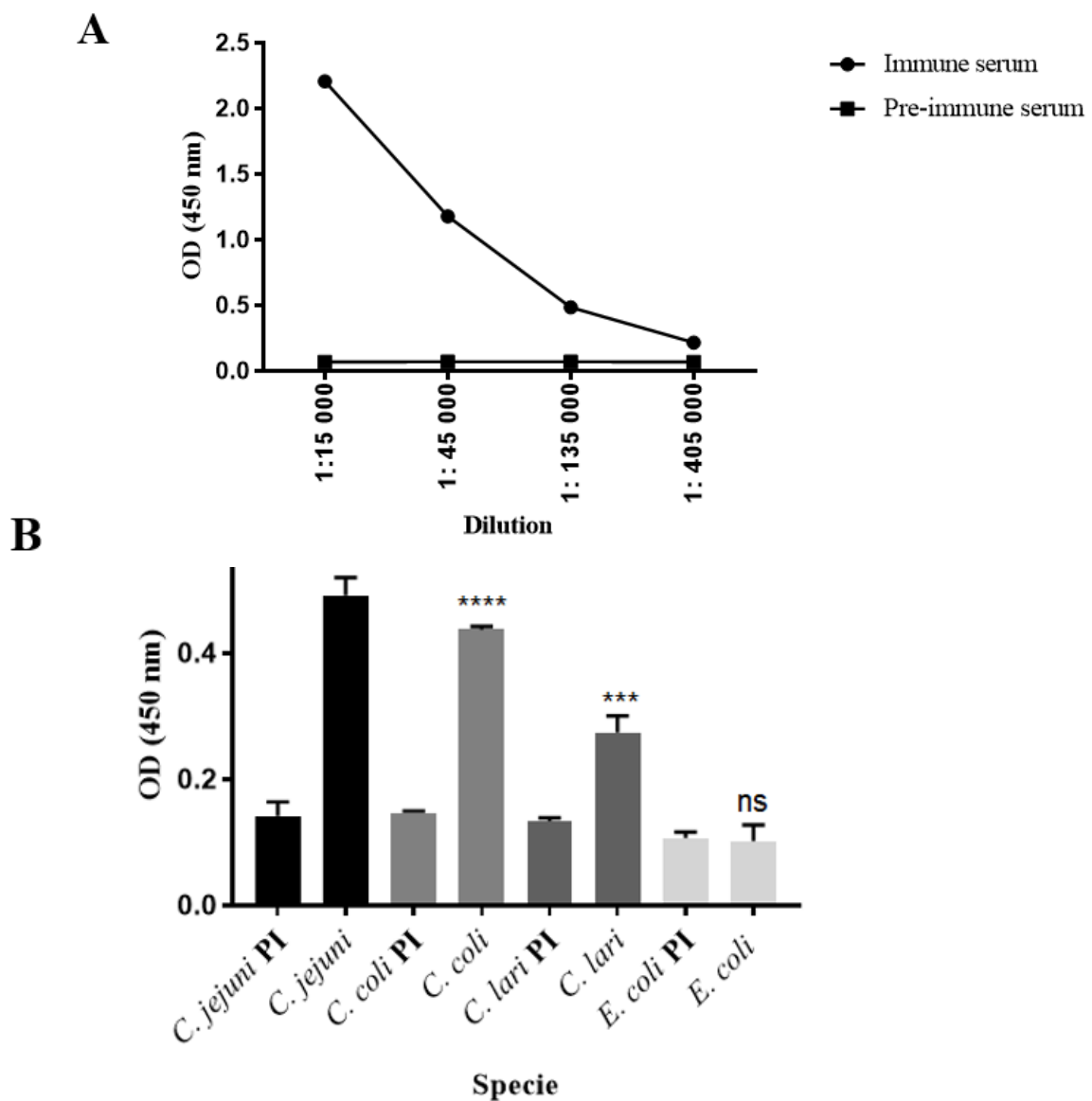
Figure 3. Transmembrane topology of *C. jejuni* CstA. Probability for transmembrane helix, inside or outside. * Target peptide position.

Epitopes were blasted to find a sequence specific for *Campylobacter*. The best result was obtained with this peptide sequence: 593GIQKIMPYEEGNKVANAVSHVAAVNIQSQKIKDLEFKLNN633 (region showed by an asterisk on Figure 3).

This peptide contains two epitopes listed in position 596 and 618 of TABLE 3. The 194 firsts BLAST results of this sequence represented the target species of *Campylobacter* with similarity percentages between 100%-70%, followed by *Arcobacter skirrowii* with 68%, *Arcobacter lanthieri* with 66% and *Arcobacter butzleri* with 62%.

Serum characterization

ELISA. ELISA against the peptide used for immunization showed a strong signal resulting in an antibody titer of $>1:405,000$ (Figure 4A). ELISA against bacterial membranes showed a signal with *Campylobacter* species and no signal with *E. coli* (Figure 4B). ELISA with bacterial lysates showed a signal for 30 members of genus *Campylobacter* species and no signal for 22 non-*Campylobacter* strains (Figure 4C).



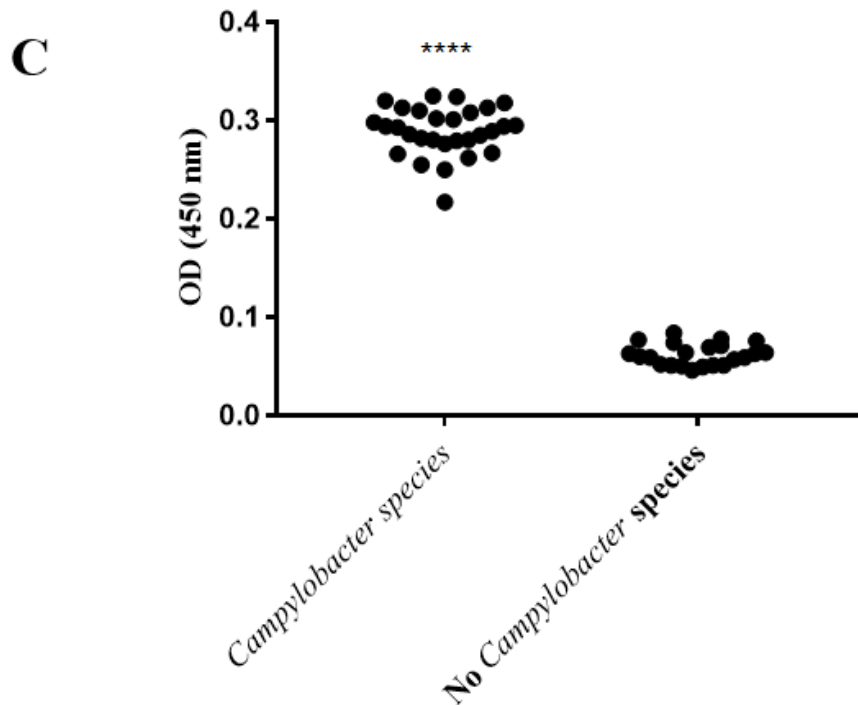


Figure 4. Characterization of the polyclonal serum by ELISA. A) Reactivity of peptide in ELISA with preimmune (PI) and immun sera. B) Reactivity of bacterial membranes in ELISA with preimmune (PI) and immun sera diluted 1:500. C) Reactivity of bacterial lysates in ELISA with the immun serum diluted 1:1,500. Bacterial strains used are listed in Table 1. Statistical analysis was performed using non-parametric one-way ANOVA: ns, no-significant; *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Western blot and mass spectrometry. All *Campylobacter* bacterial membranes gave a signal on a Western blot. There was no signal for bacterial membranes prepared from *E. coli* (Figure 5). The expected band should correspond to a molecular weight of 75 kDa. The bands revealed were not at the expected molecular weight. Bands were sent for analysis by mass spectrometry. Considering a minimum of 1 peptide with a threshold of 95%, 5 and 6 exclusive unique peptides for CstA were found in the *C. jejuni* and *C. coli* 50 kDa bands,

respectively. The result of analysis shows that the target protein is present in the 50 kDa band.

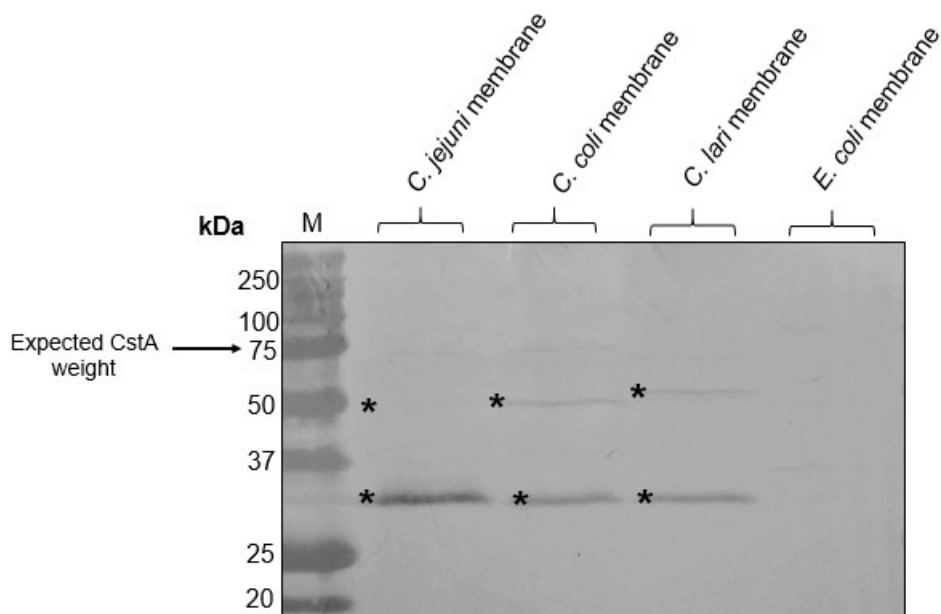


Figure 5. Western blot analysis of reaction of *C. jejuni* ATCC 33292, *C. coli* ATCC 49941, *C. lari* ATCC 35223 and *E. coli* K12 AB2847 membranes with polyclonal serum diluted 1:750. M Precision Plus Protein™, * Bands analyzed by mass spectrometry.

DISCUSSION

The methods typically employed to evaluate the presence of *Campylobacter* in food samples are based on the Horizontal Method for Detection and Enumeration of *Campylobacter* spp. (ISO 10272, 2006). These cultivation procedures are lengthy and tedious. Furthermore, due to the overgrowth of competitive bacteria on agar plates, sometimes it is difficult to identify *Campylobacter* colonies. Developing a polyclonal antibody gives an interesting tool that can be used in immunological tests that would allow a much faster and specific detection than microbiological methods for *Campylobacter* spp.

In this study three *Campylobacter* proteins were chosen as potential target for antibody production: the ferric enterobactin uptake receptor (CfrA), the carbon starvation protein (CstA), and the flagellar hook-associated protein (FlgC). These proteins showed a high amino acid homology between target *Campylobacter* species (sTable 2) and low homologies to other species.

The ferric enterobactin receptor CfrA is an outer membrane receptor responsible for high-affinity iron acquisition in *C. jejuni* by assimilating ferric enterobactin (Palyada et al., 2004). CfrA could play several other functions during the intestinal colonization by *Campylobacter*. For example, CfrA is involved in the reactivity of *C. jejuni* to the catecholamine hormone (Ximin et al., 2009). *C. jejuni* carbon starvation protein A (CstA) is also involved in peptide utilization, motility agglutination, and it plays a role in stimulating murine dendritic cells (Rasmussen et al., 2013). Finally, FlgC is a structural component of the flagellar basal body (Konkel et al., 2004). It has been shown that an orthologous FlgC of *Salmonella enterica* plays a significant role in the binding ability to the intestinal mucosa of poultry (Shippy DC et al., 2014).

The qPCR analyses allowed to discard CfrA from the potential targets because of its apparently low expression. To show that CfrA was indeed weakly expressed and that this was not an artefact, qPCRs with cultures treated with 2,2'-bipyridyl, an iron chelator, were made to create an iron-deprived environment to induce expression of iron-regulated proteins. Treatment with 2,2'-bipyridyl effectively increased the abundance of CfrA's cDNA.

Our experiments suggest that genes coding for CstA and FlgC were expressed at similar levels in *C. jejuni* and *C. coli*. In *C. lari*, *cstA* seems to be relatively more expressed than *flgC*. Studies have shown that CstA plays a role in the stimulation of murine dendritic cells (Rasmussen et al, 2013). For this characteristic, and for its good expression in *C. lari*, this protein was chosen as the target for antibody production. Furthermore, the ubiquity of the *cstA* gene among *Campylobacter* strains was demonstrated par PCR (Figure 2).

The polyclonal serum produced showed a great reactivity against the peptide. Furthermore, ELISA with bacterial membranes and lysates showed that the polyclonal immune serum recognized 30 *Campylobacter* strains and there was no cross-reaction with 22 non-target species.

Finally, the Western blot with polyclonal serum against membranes of *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* revealed a large band of about 30 kDa and a weaker band of 50 kDa. The expected band size for CstA was 75 kDa. Mass spectrometry confirmed the presence of CstA in the 50 kDa band of *C. jejuni* and *C. coli*. The western blot with *E. coli* membranes did not show a signal, thus confirming the specificity of the serum. These results indicate that this polyclonal serum is useful as a screening test for the detection of *Campylobacter* spp.

However, the use of polyclonal antibodies is prone to batch-to-batch variability. Now that we identified a well-known target, a monoclonal antibody can be developed. In this way, all batches will be identical, increasing consistency and standardization of experimental procedures and results. Moreover, hybridomas are a constant and renewable source once created.

Other than the production of a polyclonal serum, this study allowed the identification of a specific, conserved and immunogenic peptide to *Campylobacter* spp: ₅₉₃GIQKIMPYEEGNKVANAVSHVAAVNIQSQKIKDLEFKLNN₆₃₃. Linear epitopes are an important tool for clinical applications and they can be used in a wide range of tests because they are quickly synthesized. In addition, production costs using chemical synthesis are lower and easier than recombinant expression of complete proteins. Finally, specific peptides of pathogenic bacteria reduce risks associated with the use of the entire pathogen.

As *Campylobacter* continues to be the leading cause of food-borne diarrhea in humans in the developed world. Efforts to reduce or eliminate *Campylobacter* contamination should become a priority. The results of this study contribute to progress in this direction and are a step towards the development of methods for detecting this pathogen.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partly funded through the ENGAGE program supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada.

REFERENCES

Ailes, E.; Demma, L.; Hurd, S.; Hatch, J.; Jones, T.F.; Vugia, D.; Cronquist, A.; Tobin-D'Angelo, M.; Larson, K.; Laine, E.; Edge, K.; Zansky, S.; Sallan, E (2008). Continued decline in the incidence of *Campylobacter* infections Ailes. FoodNet 1996–2006. Foodborne Pathog. Dis.5, 329–337

Allos, B. M. (2001). *Campylobacter jejuni* infections: Update on emerging issues and trends. *Clinical Infectious Diseases*, 32(8), 1201-1206.

Altekruse, S.F.; Stern, N.J.; Fields, P.I.; Swerdlow, D.L. (1999) *Campylobacter jejuni* and emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 28–35.

Bhunia A. K. (2008). “Campylobacter and arcobacter,” in *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*, ed. Bhunia A. K., editor. (New York, NY: Springer), 217–226

CDC (2013). Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food-foodborne diseases active surveillance network, 10 United States Sites, 1996–2012; U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta, GA, USA; pp. 283–287.

Chen J, Liu H, Yang J, Chou K (2007) Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. *Amino Acids* 33: 423-428.

Denny, J.; Boelaert, F.; Borck, B.; Heur, O.E.; Ammon, A.; Makela, P. (2007). Zoonotic infection in Europe: Trends and figures—A summary of the EFSA-ECDC annual report. *Eur. Surveill.* 51.

EFSA (2012). EFSA explains zoonotic diseases: *Campylobacter*

EFSA: The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA J* 2010, 1496.

Havlis J, Thomas H, Sebela M, Shevchenko A. (2003). Fast-Response Proteomics by Accelerated In-Gel Digestion of Proteins. *Anal. Chem.* 75(6);1300-1306.

ISO - International Organization for Standardization. ISO 10272 microbiology of food and animal feeding stuff - horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter spp.* - Part 1: enrichment method; part 2: enumeration method.

Geneva; 2006.

Miller CE, Williams PH, Ketley JM. (2009). Pumping iron: mechanisms for iron uptake by *Campylobacter*. Microbiology 155: 3157–3165. doi:10.1099/mic.0.032425-0.

Moller S, Cronning MDR, Apweiler R. (2001). Evaluation of methods for predicting membrane spanning regions. Bioinformatics 2001, 17:646–653.

Nesvizhskii, A.I.; Keller, A.; Kolker, E.; Aebersold, R. (2003). A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. Anal. Chem. 2003, 75, 4646–4658.

Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R. (2014). The SEED and the Rapid annotation of microbial genomes using subsystems technology (RAST). Nucleic Acids Res 42: D206–D214. doi:10.1093/nar/gkt1226.

Penner, J.L. (1988) The Genus *Campylobacter*: A decade of progress. Clin. Microbiol. Rev. 1, 157-172

Rasmussen JJ, Vegge CS, Frøkiær H, Howlett RM, Krogfelt KA, Kelly DJ, Ingmer H (2013). *Campylobacter jejuni* carbon starvation protein A (CstA) is involved in peptide utilization, motility and agglutination, and has a role in stimulation of dendritic cells. J Med Microbiol. 2013; 62:1135–1143. doi: 10.1099/jmm.0.059345-0.

Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. Analytical Chemistry 68:850-858

Vandamme, P., Debruyne, L., DeBrandt, E., Falsen, E.(2010). Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. Int.J.Syst. Evol.Microbiol. 60, 2016–2022.

Ye J., McGinnis S., Madden T. L. (2006). BLAST: improvements for better sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 34, W6–W9. Doi:10.1093/nar/gkl164

Yu CS, Chen YC, Lu CH, Hwang JK. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins.* 2006;64(3):643–51. Doi: 10.1002/prot.21018.

CHAPITRE 3

DISCUSSION

Les méthodes généralement utilisées pour évaluer la présence / absence de *Campylobacter* dans les échantillons alimentaires sont la culture directe et l'enrichissement en suivant la Méthode horizontale pour la recherche et dénombrement de *Campylobacter* spp. (ISO 10272, 2006). Cette méthode est longue et fastidieuse. De plus, il est parfois difficile d'identifier les colonies de *Campylobacter* en raison de la prolifération de bactéries compétitrices sur les milieux de culture.

Le développement d'un anticorps polyclonal devient un outil intéressant, car il peut être utilisé dans des tests immunologiques qui permettent une détection plus rapide et plus spécifique.

Dans cette étude, trois protéines de *Campylobacter* ont été choisies comme cible potentielle pour la production d'anticorps : le récepteur d'entérobactine (CfrA), la protéine de famine du carbone A (CstA), et finalement la protéine associée au crochet flagellaire (FlgC). Ces protéines présentaient une forte homologie des acides aminés entre les espèces cibles de *Campylobacter* et une faible homologie à d'autres espèces non cible.

Le récepteur d'entérobactine CfrA est un récepteur à haute affinité situé sur la membrane externe de *Campylobacter jejuni* et est responsable de l'acquisition de fer en assimilant l'entérobactine (Palyada et al., 2004). Il semble que CfrA joue plusieurs autres fonctions pendant la colonisation intestinale par *Campylobacter*. Par exemple, elle est impliquée dans la réactivité de *C. jejuni* à l'hormone de catécholamine (Ximin et al., 2009). Ensuite, la protéine de famine du carbone A (CstA) de *Campylobacter jejuni* est impliquée dans l'utilisation des peptides, la motilité et l'agglutination. Enfin, la protéine associée au crochet flagellaire FlgC est une composante structurelle du corps basal du flagelle (Konkel et al., 2004). Il a été démontré qu'une FlgC orthologue de *Salmonella enterica* joue un rôle important dans la capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale de la volaille (Shippy et al., 2014).

L'analyse par qPCR a permis d'exclure CfrA des cibles potentielles en raison de son apparemment plus faible expression. Pour montrer que CfrA était effectivement faiblement exprimé et qu'il ne s'agissait pas d'une erreur technique, un qPCR en utilisant des cultures traitées avec du 2,2'-bipyridyl, un chélateur de fer, a été fait afin de créer un environnement privé de fer pour induire la production de protéines exprimées lors d'une carence en fer. Le traitement par le 2,2'-bipyridyl a effectivement augmenté la quantité d'ADNc de cette protéine. Ces résultats ont validé les résultats de l'expression relative des autres gènes testés.

Les expériences suggèrent que les gènes codant pour CstA et FlgC sont exprimés de manière équivalente dans *C. jejuni* et *C. coli*. Dans *C. lari*, *cstA* semble relativement plus exprimé que *flgC*. Des études ont montré que CstA joue un rôle dans la stimulation des cellules dendritiques murines (Rasmussen et al, 2013). Pour cette caractéristique, et pour sa bonne expression dans *C. lari*, cette protéine a été choisie comme cible pour la production d'anticorps.

L'ubiquité du gène *cstA* dans 44 souches de *Campylobacter* a été démontrée par PCR. Le sérum polyclonal produit a montré une grande réactivité contre le peptide synthétique. De plus, l'ELISA avec des membranes bactériennes et des lysats a montré que le sérum immun polyclonal reconnaissait 30 souches de *Campylobacter* et qu'il n'y avait aucune réaction croisée avec 22 espèces non cibles.

Finalement, l'immunobuvardage avec le sérum polyclonal contre les membranes de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* a révélé une bande intense d'environ 30 kDa et une bande plus faible de 50 kDa. La spectrométrie de masse a confirmé la présence de CstA dans la bande de 50 kDa. D'un autre côté, l'immunobuvardage avec des membranes d'*E. coli* n'a pas montré de signal, confirmant ainsi la spécificité du sérum.

Ces résultats indiquent que ce sérum polyclonal est utile comme outil de dépistage pour la détection de *Campylobacter* spp. Il a un large éventail d'applications. Il peut être utilisé dans plusieurs tests de détection immunologiques, comme l'ELISA et différents tests à flux latéral. Il peut notamment être utilisé dans la technologie immuno-chromatographique magnétique (MICT). Le principe de la méthode MICT est semblable à celui des autres tests immunologiques à flux latéral. Par contre, les nanoparticules magnétiques remplacent les particules d'or ou de latex utilisés dans les autres tests à lecture optique. Dans les tests à lecture optique, les autres composantes de l'échantillon peuvent parfois causer des interférences. Ces interférences peuvent masquer les particules colorées destinées à être détectées. De plus, les méthodes optiques détectent seulement le signal de la couche supérieure de la membrane, si la répartition des particules est éloignée de la surface de la bandelette, cela peut entraîner des inexactitudes. Contrairement aux procédés à flux latéral classiques, la présence d'autres molécules dans l'échantillon n'interfère pas avec le signal magnétique. Par leur nature, le signal magnétique des particules super paramagnétiques ne peut pas être masqué ou optiquement caché du détecteur

MICT®. De plus, le lecteur détecte le signal magnétique dans tout le volume de la membrane. Finalement, la mesure magnétique est directement liée à la quantité de matériau magnétique accumulé dans la région de capture, ce qui en fait un test quantitatif. D'un autre côté, la technologie MICT est plus abordable et plus facile à utiliser que les méthodes basées sur la détection d'ADN, par exemple le PCR. De plus, elle ne nécessite pas de personnel spécialisé.

Cependant, l'utilisation d'anticorps polyclonaux peut mener à une variabilité entre les différents lots. Maintenant qu'une cible a été identifiée, des anticorps monoclonaux peuvent être produits à partir du même peptide. De cette façon, tous les lots seront identiques, augmentant ainsi l'uniformité et la normalisation des procédures expérimentales et des résultats. En outre, les hybridomes sont une source constante et renouvelable une fois créés.

Outre la production d'un sérum polyclonal, cette étude a permis d'identifier un peptide spécifique, conservé et immunogène de *Campylobacter* spp: ⁵⁹³GIQKIMPYEEGNKVANAVSHVAAVNIQSQKIKDLEFKLNN₆₃₃. Les épitopes linéaires sont un outil important pour les applications cliniques et ils peuvent être utilisés dans différents tests, car ils sont rapidement synthétisés. De plus, les coûts de production de la synthèse chimique sont relativement faibles et plus faciles que l'expression recombinante de protéines complètes. D'un autre côté, les peptides spécifiques de bactéries pathogènes réduisent le risque associé à l'utilisation des agents pathogènes entiers.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Campylobacter continue d'être un agent pathogène émergent dans le monde entier. Par conséquent, il est impératif que l'industrie alimentaire reconnaisse la persistance accrue des infections à *Campylobacter* en tant que grave risque pour la santé publique et prenne des mesures pour améliorer la sécurité alimentaire. Les efforts visant à réduire ou à éliminer la contamination de *Campylobacter* dans l'industrie alimentaire doivent devenir une priorité. La consommation de produits de volaille insuffisamment cuits et la contamination croisée des carcasses et autres produits alimentaires continuent d'être un problème de santé publique majeur. De plus, il y a une émergence de *Campylobacter* résistants aux antibiotiques et il existe encore de nombreux aspects de la physiologie de ce pathogène qui n'ont pas encore été élucidés. Tous les facteurs mentionnés ci-dessus augmentent la nécessité de réglementations plus strictes en matière de sécurité alimentaire, de nouvelles recherches et l'application de nouvelles stratégies. Les résultats de ce projet contribuent à avancer dans cette direction et constituent une avancée vers l'élaboration de méthodes de détection de ce pathogène.

BIBLIOGRAPHIE

Abeyta, C., Trost, P. A., Bark, D. H., Hunt, J. M., Kaysnet, C. A., and Wekell, M. M. (1997). The use of bacterial membrane fractions for the detection of *Campylobacter* species in shellfish. *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* 5, 223–247.

Ailes, E.; Demma, L.; Hurd, S.; Hatch, J.; Jones, T.F.; Vugia, D.; Cronquist, A.; Tobin-D'Angelo, M.; Larson, K.; Laine, E.; Edge, K.; Zansky, S.; Sallan, E (2008). Continued decline in the incidence of *Campylobacter* infections. FoodNet 1996–2006. *Foodborne Pathog. Dis.* 5, 329–337

Allos, B. M. (2001). *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. *Clin. Infect. Dis.* 32, 1201–1206.

Backert S., Boehm M., Wessler S., Tegtmeyer N. (2013). Transmigration route of *Campylobacter jejuni* across polarized intestinal epithelial cells: paracellular, transcellular or both? *Cell Commun. Signal.* 11-72 doi:10.1186/1478-811X-11-72

Baggerman, W. I., and Koster, T. (1992). A comparison of enrichment and membrane filtration methods for the isolation of *Campylobacter* from fresh and frozen foods. *Food Microbiol.* 9, 87–94.

Baylis, C. L., MacPhee, S. A., Martin, K. W., Humphrey, T. J., and Betts, R. P. (2000). Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. *J. Appl. Microbiol.* 89, 884–891.

Belenguer A., Holtrop G., Duncan S. H., Anderson S. E., Calder A. G., Flint H. J., Lobley G. E. (2011). Rates of production and utilization of lactate by microbial communities from the human colon. *FEMS Microbiol. Ecol.* 77, 107–119 doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01086.x

Bolton FJ, Hutchinson DN, Coates D. Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *J Clin Microbiol.* 1984 Feb;19(2):169–171

Bolton, F.J. and Robertson, L. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. J. Clin. Pathol. 1982, 35, pp. 462-467

Bull, S.A.; Allen, V.M.; Domingue, G.; Jorgensen, J.A.; Frost, R.; Ure, R.; Whyte, D.; Tinker, J.E.; Corry, J.; Gillard-King, J.; T.J., H. Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 645–652.

Cawthraw, S.A., Wassenaar, T.M., Ayling, R., Newell, D.G., 1996. Increased colonization potential of *Campylobacter jejuni* strain 81116 after passage through chickens and its implication on the rate of transmission within flocks. *Epidemiol. Infect.* 117, 213e215.

CDC (2013). Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly through Food-foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 United States Sites, 1996–2012; U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta, GA, USA; pp. 283–287.

Debretsion, A., Habtemariam, T., Wilson, S., Ngawa, D., and Yehualaeshet, T. (2007). Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Campylobacter jejuni* on chicken rinses from poultry processing plant. *Mol. Cell. Probes* 21, 177–181.

Denny, J.; Boelaert, F.; Borck, B.; Heur, O.E.; Ammon, A.; Makela, P. (2007). Zoonotic infection in Europe: Trends and figures—A summary of the EFSA-ECDC annual report. *Eur. Surveill.* 51.

Duncan S. H., Holtrop G., Lobley G. E., Calder A. G., Stewart C. S., Flint H. J. (2004). Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *Br. J. Nutr.* 91, 915–923 doi :10.1079/BJN20041101

EFSA (2012). Les zoonoses expliquées par l'EFSA : *Campylobacter*.

EFSA: The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA J* 2010, 1496.

Goldstein R. E. R., Cruz-Cano R., Jiang C., Palmer A., Blythe D., Ryan P., et al. (2016). Association between community socioeconomic factors, animal feeding operations, and campylobacteriosis incidence rates: Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 2004–2010. *BMC Infect. Dis.* 16:354 doi:10.1186/s12879-016-1686-9.

Guccione E., Hitchcock A., Hall S. J., Mulholland F., Shearer N., van Vliet A. H., Kelly D. J. (2010). Reduction of fumarate, mesaconate and crotonate by Mfr, a novel oxygen-regulated periplasmic reductase in *Campylobacter jejuni*. *Environ. Microbiol.* 12, 576–591 doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02096.x

Guerry, P. (2007). *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol.* 15, 456–461.

Hamrita T. K., Conway R. H. (2017). Effect of air velocity on deep body temperature and weight gain in the broiler chicken. *J. Appl. Poult. Res.* 26 111–121. Doi:10.3382/japr/pfw051

Heredia N., Wesley I., Garcia S. Foodborne Pathogens and Toxins: Overview. John Wiley & Sons; Hoboken, NJ, USA: 2009. Microbiologically Safe Foods; pp. 20–22.

Hofreuter D., Novik V., Galan J. E. (2008). Metabolic diversity in *Campylobacter jejuni* enhances specific tissue colonization. *Cell Host Microbe* 4, 425–433 doi: 10.1016/j.chom.2008.10.002

ISO. (2006). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for Detection and Enumeration of *Campylobacter* spp. [ISO 10272:2006].

Jain, D., Prasad, K. N., Sinha, S., and Husain, N. (2008). Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative *Campylobacter jejuni* strains. *J. Med. Microbiol.* 57, 267–272.

Jin, S., Joe, A., Lynett, J., Hani, E.K., Sherman, P., Chan, V.L., 2001. JlpA, a novel surface exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 39, 1225-1236.

Kaakoush N. O., Castaño-Rodríguez N., Mitchell H. M., Man S. M. (2015). Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 28 687–720. Doi :10.1128/CMR.00006-15

Kaakoush N. O., Mitchell H. M., Man S. M. (2014). Role of emerging *Campylobacter* species in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 2189–2197. Doi: 10.1097/MIB.0000000000000074

King, S., and Adams, M.C. (2008). Incidence of *Campylobacter* in processed poultry: is it a concern for human health? *J. FoodSaf.* 28, 376–388.

Konkel, M.E., Garvis, S.G., Tipton, S.L., Anderson Jr., D.E., Cieplak Jr., W., 1997. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* 24, 953-963.

Lehtola, M. J., Pitkanen, T., Miebach, L., and Miettinen, I. T. (2006). Survival of *Campylobacter jejuni* in potable water biofilms: a comparative study with different detection methods. *Water Sci. Technol.* 54, 57–61.

Line J. E., Hiett K. L., Guard-Bouldin J., Seal B. S. (2010). Differential carbon source utilization by *Campylobacter jejuni* 11168 in response to growth temperature variation. *J. Microbiol. Methods* 80, 198–202. Doi: 10.1016/j.mimet.2009.12.011

Meade KG, Narciandi F, Cahalane S, Reiman C, Allan B, O'Farrelly C (2009) Comparative in vivo infection models yield insights on early host immune response to *Campylobacter* in chickens. *Immunogenetics* 61:101–110

Méndez-Olvera, E. T., Bustos-Martínez, J. A., López-Vidal, Y., Verdugo-Rodríguez, A., & Martínez-Gómez, D. (2016). Cytolethal distending toxin from *Campylobacter jejuni* requires the cytoskeleton for toxic activity. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(10), e35591.

Meunier M., Guyard-Nicodème M., Hirchaud E., Parra A., Chemaly M., Dory D. (2016). Identification of novel vaccine candidates against *Campylobacter* through reverse vaccinology. *J. Immunol. Res.* 2016:5715790 doi:10.1155/2016/5715790

Monteville, M.R., Yoon, J.E., Konkel, M.E., 2003. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology* 149, 153-165.

Moore, J.E.; Corcoran, D.; Dooley, J.S.G.; Fanning, S.; Lucey, B.; Matsuda, M.; McDowell, D.A.; Megraud, F.; Millar, B.C.; Mahoney, R.O.; Riordan, L.O.; Rourke, M.O.; Rao, J.R.; Sails, A.; Whyte, P. *Campylobacter*. *Vet. Res.* 2005, 36, 351–382.
Nachamkin, I.; Szymanski, M.C.; Blaser, J.M. *Campylobacter*, 3rd ed.; ASM Press: Washington DC.

On, S. L. W. (2001). Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: status, prospects and immediate concerns. *Journal of Applied Microbiology* 90, 1S–15S.

Parkhill J., Wren B. W., Mungall K., Ketley J. M., Churcher C., Basham D., Chillingworth T., Davies R. M., Feltwell T., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A. V., Moule S., Pallen M. J., Penn C. W., Quail M. A., Rajandream M. A., Rutherford K. M., van Vliet A. H., Whitehead S., Barrell B. G. (2000). The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403, 665–668 doi:10.1038/35001088

Penner, J. L. (1988) The Genus *Campylobacter*: A decade of progress. *Clin. Microbiol. Rev.* 1, 157-172.

Poly, F., and Guerry, P. (2008). Pathogenesis of *Campylobacter*. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24, 27–31.

Portner, D. C., Leuschner, R. G. K., and Murray, B. S. (2007). Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology* 54, 265–270.

Rosenquist H., Nielsen N. L., Sommer H. M., Nørrung B., Christensen B. B. (2003). Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *Int. J. Food Microbiol.* 83 87–103. Doi:10.1016/S0168-1605(02)00317-3

Sahin O., Luo N., Huang S., Zhang Q. (2003). Effect of *Campylobacter*-specific maternal antibodies on *Campylobacter jejuni* colonization in young chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 5372–5379. Doi: 10.1128/AEM.69.9.5372-5379.2003

Scharff R.L. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *J. Food. Prot.* 2012; 75:123–131. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-058.

Schulze, F., Hanel, I., Borrmann, E., 1998. Formation of cytotoxins by enteric *Campylobacter* in humans and animals. *Zentralbl. Bakteri.* 288, 225-236.

Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P.A., Teixeira, P., 2011. *Campylobacter spp.* as a foodborne pathogen: a review. *Front. Microbiol.* 2, 200
Stahl M., Butcher J., Stintzi A. (2012). Nutrient acquisition and metabolism by *Campylobacter jejuni*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2-5 doi:10.3389/fcimb.2012.00005

Skirrow, M.B. (2006). John Mc Fadyean and the centenary of the first isolation of *Campylobacter* species. *Clin. Infect. Dis.* 43, 1213–1217.

Thomas M. T., Shepherd M., Poole R. K., van Vliet A. H., Kelly D. J., Pearson B. M. (2011). Two respiratory enzyme systems in *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 contribute to growth on L-lactate. *Environ. Microbiol.* 13, 48–61 doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02307.x

Van Deun, K., Haesebrouck, F., Heyndrickx, M., Favoreel, H., Dewulf, J., Ceelen, L., Dumez, L., Messens, W., Leleu, S., Van Immerseel, F., Ducatelle, R., Pasmans, F., 2007. Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. *J. Med. Microbiol.* 56, 1284-1289.

Vandamme, P. (2000). “Taxonomy of the family Campylobacteraceae,” in *Campylobacter*, eds I. Namchamkin and M. J. Blaser (Washington, DC: ASM), 3–27.

Velayudhan J., Kelly D. J. (2002). Analysis of gluconeogenic and anaplerotic enzymes in *Campylobacter jejuni*: an essential role for phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Microbiology* 148, 685–694.

Wilma, C., Hazeleger, R. R., Beumer, F. D., and Rombouts, F. M. (1992). The use of latex agglutination tests for determining *Campylobacter* species. *Lett. Appl. Microbiol.* 14, 181–184.

Wright J. A., Grant A. J., Hurd D., Harrison M., Guccione E. J., Kelly D. J., Maskell D. J. (2009). Metabolite and transcriptome analysis of *Campylobacter jejuni* in vitro growth reveals a stationary-phase physiological switch. *Microbiology* 155, 80–94 doi :10.1099/mic.0.030429-0.

